

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 504 465**

51 Int. Cl.:

A23L 3/3463 (2006.01)

B65D 81/26 (2006.01)

A23L 3/3571 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2006** **E 06805586 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.06.2014** **EP 1962621**

54 Título: **Absorbente de oxígeno microbiano**

30 Prioridad:

21.11.2005 DK 200501623

21.11.2005 US 738031 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

08.10.2014

73 Titular/es:

ARLA FOODS AMBA (50.0%)

Sønderhøj 14

8260 Viby J, DK y

CHR. HANSEN A/S (50.0%)

72 Inventor/es:

LILLEVANG, SØREN K.;

MORTENSEN, GRITH;

KRISTENSEN, METTE NØRTOFT;

PEDERSEN, HENRIK SKOU;

FRIIS, TORBEN LOHSE y

SØRENSEN, NIELS KRISTIAN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 504 465 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Absorbente de oxígeno microbiano

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a los campos de los materiales de envasado, la microbiología y métodos para conservar productos alimenticios.

10 Antecedentes de la invención

Se usan un gran número de métodos para preservar productos alimenticios. Entre estos métodos está el uso de conservantes antimicrobianos, por ejemplo, productos químicos como nitrato, dióxido de azufre, ácido benzoico, y proteínas tales como nisina y pediocina. Otro método es la adición de un antioxidante tal como ácido ascórbico, ácido cítrico y tocoferoles. Los antioxidantes evitan la oxidación de los alimentos, que de otro modo podría dar como resultado rancidez y decoloración.

El documento EP 0 092 183 B1 divulga un método para la preservación de alimentos proporcionando un cultivo en el alimento que contiene lactosa, el cual genera una sustancia inhibidora del deterioro por bacterias.

El documento WO 01/52668 divulga bacterias de ácido láctico que contienen porfirina y su uso para reducir el contenido de oxígeno en un producto alimenticio.

El oxígeno es un factor de deterioro de la calidad importante respecto a muchos productos alimenticios. El oxígeno puede causar el crecimiento de mohos y el desarrollo de sabores rancios, que en consecuencia reducen la calidad y vida útil de muchos productos alimenticios. Por lo tanto, es deseable reducir el contenido de oxígeno en el aire que esté en contacto con el producto alimenticio dentro del envase. El envasado en atmósferas modificadas con bajo oxígeno residual se ha introducido para reducir los cambios de calidad asociados con la presencia de oxígeno.

En la actualidad, el contenido residual de oxígeno en alimentos envasados puede reducirse mediante las siguientes estrategias:

- Repitiendo ciclos de vacío e inyección de gas para reducir el contenido residual de oxígeno. Este método es caro con respecto tanto a las cantidades de gas usadas como al tiempo empleado para los ciclos de inyección de gas. Por lo tanto, dan como resultado aumentos significativos en el coste de envasado.
- Uso de un absorbente químico de oxígeno. Los presentes sistemas utilizan uno o más de los siguientes conceptos: oxidación de polvo de hierro, oxidación de ácido ascórbico, oxidación de tinte fotosensible, oxidación enzimática (por ejemplo, glucosa oxidasa y alcohol oxidasa), ácidos grasos insaturados (por ejemplo, ácido oleico o ácido linoleico), o levaduras inmovilizadas sobre un material sólido (Vermeiren et al., 1999, 2003). La mayor parte de los absorbentes químicos de oxígeno disponibles comercialmente en la actualidad se basan en la oxidación de polvo de hierro. Adicionalmente, se ha propuesto la retirada enzimática de oxígeno como una técnica prometedora (Vermeiren et al., 1999, 2003). Los materiales absorbentes de oxígeno se incorporan a etiquetas, bolsitas, o dentro del material de envasado. Las desventajas de estos sistemas son que la eficiencia del absorbente es por lo general baja y el tiempo usado antes de que el sistema se active es inaceptablemente largo. Además, aspectos legales en relación a productos alimenticios en algunos casos impiden el uso de estos sistemas.

Los productos alimenticios envasados al vacío o con una atmósfera modificada son susceptibles a defectos en el envase, y el oxígeno entra en el envase cuando se abre el paquete durante su uso. Además, obtener un bajo contenido residual de oxígeno en el proceso de envasado consume tiempo y es costoso.

Por tanto, hay una necesidad en la industria alimentaria de encontrar vías alternativas o complementarias para reducir el contenido residual de oxígeno en alimentos envasados. Dichas vías alternativas para reducir el contenido residual de oxígeno tienen que cumplir con la legislación reguladora de alimentos así como con las preferencias del consumidor.

Sumario de la invención

Por consiguiente, la presente invención proporciona en un aspecto un envase para alimentos, que comprende un material de envasado y un absorbente microbiano de oxígeno seleccionado de las cepas absorbentes de oxígeno de *Lactococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Brevibacterium spp.*, *Propionibacterium spp.* y *Bifidobacterium spp.*

En una realización preferida de la invención dicho absorbente microbiano de oxígeno se aplica, tal como por una operación de rociado, sobre la superficie de dicho material de envasado adaptado para encarar a un compartimento de almacenamiento de alimentos de dicho envase.

En otro aspecto de la presente invención se proporciona una bolsita, etiqueta, cápsula, o gránulos de polvo liofilizado que comprenden dicho absorbente microbiano de oxígeno seleccionado de cepas absorbentes de oxígeno de *Lactococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Brevibacterium spp.*, *Propionibacterium spp.* y *Bifidobacterium spp.* y los sustratos necesarios para que el absorbente microbiano de oxígeno asimile el oxígeno en exposición a vapor de agua.

En un tercer aspecto de la presente invención se proporciona un producto envasado en un envase para alimentos, que comprende un material de envasado y un absorbente microbiano de oxígeno seleccionado de las cepas absorbentes de oxígeno de *Lactococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Brevibacterium spp.*, *Propionibacterium spp.* y *Bifidobacterium spp.*; en donde dicho absorbente microbiano de oxígeno se ha aplicado a la superficie del producto alimenticio.

Finalmente, la presente invención proporciona un método de conservación de un producto alimenticio envasando dicho alimento en un envase para alimentos, que comprende un material de envasado y un absorbente microbiano de oxígeno seleccionado de las cepas absorbentes de oxígeno de *Lactococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Brevibacterium spp.*, *Propionibacterium spp.* y *Bifidobacterium spp.*; en donde dicho absorbente microbiano de oxígeno se aplica a la superficie del producto alimenticio.

El absorbente microbiano de oxígeno es preferentemente un microorganismo que consuma oxígeno con poca o ninguna producción concomitante de dióxido de carbono y ácidos orgánicos. Un ejemplo de dicho microorganismo es una cepa de *Lactococcus lactis*, que usa oxígeno y produce cantidades limitadas de diacetilo y acetoina.

El absorbente microbiano de oxígeno puede aplicarse a una bolsita, etiqueta, cápsula, o como gránulos liofilizados colocados en el paquete de manera que se minimice la transferencia de dicho absorbente microbiano de oxígeno sobre dicho alimento. El absorbente microbiano de oxígeno puede incorporarse en el material de envasado, por ejemplo, en una estructura laminada o recubrimiento. El producto alimenticio puede tener un bajo contenido de oxígeno en el envase incluso después de que el consumidor haya abierto repetidas veces el envase.

Una ventaja de la presente invención es que se puede usar una velocidad mayor de las máquinas envasadoras porque el oxígeno residual en el momento del envasado puede aumentarse. Otra ventaja es que el contenido de oxígeno en el envase alimentario puede disminuirse repetidas veces después de abrir y cerrar el envase.

Descripción de los dibujos

La Fig. 1a es una ilustración esquemática de la incorporación de un absorbente microbiano de oxígeno en un material de envasado para alimentos,

La Fig. 1b es una ilustración esquemática del absorbente microbiano de oxígeno rociándose sobre la superficie del material de envasado que encara al alimento,

La Fig. 1c muestra una aplicación alternativa de un absorbente microbiano de oxígeno.

La Fig. 2 muestra el contenido de oxígeno medido en muestras almacenadas durante 0-20 días a 9 °C. Las líneas punteadas con puntos blancos son muestras sin el absorbente microbiano de oxígeno. Las líneas continuas con puntos negros son muestras con el absorbente microbiano de oxígeno. Determinaciones triples. Se efectuaron medidas consecutivas en el mismo paquete durante el experimento, y

La Fig. 3 muestra el contenido de oxígeno medido en muestras almacenadas durante 0-20 días a 20 °C. Las líneas punteadas con puntos blancos son muestras sin el absorbente microbiano de oxígeno. Las líneas continuas con puntos negros son muestras con el absorbente microbiano de oxígeno. Determinaciones triples. Se efectuaron medidas consecutivas en el mismo paquete durante el experimento.

Descripción detallada de la invención

Fig. 1a muestra un producto alimenticio perecedero 10 almacenado en un envase 20 que comprende una parte superior conformada 22 formada a partir de un material en capas 22' y que tiene una lámina 28 unida a un borde periférico 26 del mismo. Como se muestra, una parte de fondo de tipo bandeja 27 puede romperse en el borde 26.

El material en capas 22' de la parte superior 22 puede comprender tres capas 23, 24, 25, con una capa superior o exterior 23 definiendo una barrera adaptada para evitar de manera convencional la entrada en el envase 20 de aire que pueda dar lugar a un rápido deterioro del producto alimenticio 10 y por tanto se reduzca el tiempo durante el que el producto 10 permanecerá fresco antes de la apertura del envase 20 por la retirada de la lámina 28. La capa central o interna 24 del material en capas 22' se define por o incluye un material absorbente microbiológico de oxígeno que se discutirá con más detalle más adelante. Una capa adicional 25 define una superficie del envase 20 que encara al producto 10, y la capa 25 es permeable para permitir la comunicación gaseosa entre la capa 24 y el interior del envase 20.

Preferentemente, el material de la capa superior 23 y la lámina 28 comprenden una capa de PE para asegurar el sellado. La capa permeable 25 se produce preferentemente a partir de una malla de PE perforada. Se indica, sin embargo, que el envase 20 puede fabricarse a partir de vidrio o un metal, con la capa de absorbente microbiano de oxígeno 24 aplicada en la superficie de la misma que encara el interior. La lámina 28 también puede definirse mediante un material en capas que tenga propiedades idénticas o similares a las del material en capas 22'. En una realización, el envase 20 puede tener regiones, tales como los lados 21 de la parte superior 22, donde no se proporciona absorbente microbiano de oxígeno.

En la realización mostrada en la Fig. 1a, la parte superior 22 se produce para mantener una forma donde un espacio superior relativamente grande 15 se define entre el producto alimenticio 10 y la parte superior 22; la parte superior 22 puede, sin embargo, conformarse de tal forma que el producto alimenticio 10 se ajuste estrechamente en ella.

Se indica que el material en capas 22' con el absorbente microbiano de oxígeno se fabrica preferentemente tiempo antes de la fabricación del envase 20; sin embargo, en algunos casos, tales como cuando el tiempo de vida o actividad la capa de material absorbente microbiano de oxígeno 24 es corta o crítica, puede preferirse producir el material en capas 22' inmediatamente antes del momento cuando el envase 20 se sella mediante la lámina 28, reduciendo por tanto el periodo de tiempo en el que la capa de material 24 está expuesta a oxígeno atmosférico.

El material en capas 22' puede formarse, como alternativa, sin la capa permeable 25 en donde no se requiera protección o control de la actividad de la capa absorbente microbiológica de oxígeno 24. La Fig. 1b muestra un ejemplo tal donde el material en capas 22' comprende una capa superior 23 como se describe anteriormente y que porta una capa de un absorbente microbiano de oxígeno rociado o de otro modo aplicado a la capa 23. Dicho material en capas 22' para la parte superior 22 puede fabricarse justo antes de que se conforme la parte superior 22 como por moldeado por inyección o embutición profunda.

En lo anterior, el envase 20 se ha descrito anteriormente definiendo un espacio superior 15 bien definido por el envase 20 incluyendo una parte 22 adaptada para mantener su forma durante el uso normal. Sin embargo, el uso de un envase flexible que incluye un material absorbente microbiológico de oxígeno envuelto alrededor del producto alimenticio 10 también se encuentra dentro del concepto general de la presente invención.

La Fig. 1c muestra una realización alternativa de la invención donde una capa 24 de un material absorbente microbiológico de oxígeno se ha aplicado a la superficie del producto alimenticio 10, estando fabricado el envase 20 a partir de cualquier material no permeable a gas convencional para evitar la entrada de aire en el envase 20. El material absorbente microbiano de oxígeno puede aplicarse rociando una lechada del mismo sobre el producto 10 antes o durante el envasado. La lechada puede comprender opcionalmente uno o más nutrientes para el absorbente microbiano de oxígeno, por ejemplo, una fuente de carbono y/o nitrógeno. Cuando el alimento es un queso, la aplicación del absorbente microbiano de oxígeno sobre el queso puede estar seguida de la aplicación sobre el producto alimenticio 10 de un recubrimiento semipermeable a gas, por ejemplo, recubrimiento de plástico Dutch, cera de parafina u otros recubrimientos basados en lípidos.

En otra realización preferida más (no mostrada) el absorbente microbiano de oxígeno puede aplicarse a una bolsita separada o etiqueta situada dentro del envase 20 de la Fig. 1c, o el absorbente microbiano de oxígeno, preferentemente en forma de gránulos liofilizados, puede introducirse en el envase 20 antes del sellado del mismo. Cuando está en forma líquida, el absorbente microbiano de oxígeno puede inyectarse en el envase 20 perforando el envase 20 y volviendo a sellarlo.

Los productos alimenticios 10 envasados de acuerdo con métodos convencionales a menudo se estropean rápidamente debido al oxígeno presente en el envasado, es decir, ya sea en el espacio superior entre el envase y el producto alimenticio o en el producto alimenticio en sí. Aunque los productos alimenticios pueden empaquetarse al vacío o en una atmósfera modificada, obtener un contenido residual de oxígeno altamente reducido en el proceso de envasado consume tiempo y es costoso.

El uso de un material absorbente microbiano de oxígeno como se menciona anteriormente permite una reducción del contenido residual de oxígeno por el absorbente microbiano de oxígeno asegurando que la concentración de oxígeno en el envase 20 disminuye continuamente, preferentemente hasta que se agote, después del cierre del envase 20. La invención es útil cuando el producto alimenticio 10 se empaqueta al vacío o en una atmósfera modificada e incluso cuando el producto alimenticio 10 se empaqueta en aire atmosférico.

Además, puede asegurarse un tiempo de vida prolongado del producto alimenticio 10 mediante el efecto del material absorbente microbiano de oxígeno después de la apertura del envase 20 por el consumidor cuando el acceso del aire atmosférico al interior del envase 20 ya no está restringido.

El absorbente microbiano de oxígeno se selecciona de microorganismos clasificados como GRAS (por sus siglas en inglés *Generally Recognised As Safe*, Generalmente Reconocidos Como Seguros) y de cepas absorbentes de oxígeno de *Lactococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Brevibacterium spp.*, *Propionibacterium spp.*, y *Bifidobacterium spp.*

Muchos microorganismos usan oxígeno durante su metabolismo. Algunos, sin embargo, producen ácidos, alcoholes, gases, y compuestos con aroma durante este proceso, que pueden causar cambios sensoriales y físicos no deseados en los alimentos. En una realización de la invención, el absorbente microbiano de oxígeno usa oxígeno sin reducir seguidamente el pH o producir cantidades significativas de gases. En otra realización, el absorbente microbiano de oxígeno es un microorganismo que también produce un cambio en el sabor del producto alimenticio. Este cambio de sabor del producto alimenticio puede ser deseable para algunas aplicaciones, por ejemplo, en relación con algunos productos lácteos.

En su forma natural, las especies anteriores pueden no absorber oxígeno lo suficientemente rápido y a bajas concentraciones de oxígeno como se desea cuando se usan como absorbentes microbianos de oxígeno de acuerdo con la presente invención. La velocidad de consumo de oxígeno de los microorganismos puede mejorarse cambiando a los microorganismos ya sea por modificaciones de cultivo, modificación introduciendo mutaciones o mediante otras modificaciones genéticas.

La primera opción es producir los microorganismos en condiciones donde adquieran o mejoren su capacidad de absorber (metabolizar) oxígeno. Una forma de lograr esto es producir los microorganismos en un medio que contiene porfirina, por ejemplo, como hemina. Los microorganismos pueden de este modo "cargarse" con un compuesto de porfirina, permitiendo a los microorganismos que no contienen naturalmente compuestos de porfirina o que no contienen suficientes compuestos de porfirina, por ejemplo, *Lactococcus*, absorber oxígeno. Se hace referencia al documento WO 01/52668 en donde una cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (DSM 12015) se cultiva en un medio que contiene hemina, dando por tanto como resultado bacterias que contienen al menos 0,1 ppm en peso seco de un compuesto de porfirina.

Otra opción para modificar un microorganismo como una bacteria de ácido láctico, es introducir una o más mutaciones que causen un desplazamiento en el metabolismo de tal forma que la absorción de oxígeno mediante metabolismo se aumenta. En una realización una bacteria de ácido láctico es defectuosa en Ldh, Ldh⁻, es decir, se ha introducido una mutación que causa una actividad defectuosa de lactato deshidrogenasa. Las cepas Ldh⁻ no pueden regenerar NAD⁺ a partir de NADH reduciendo piruvato a ácido láctico, y estas cepas tienen que servirse de otras reacciones para regenerar NAD⁺, por ejemplo, NADH oxidasa codificada por el gen *nox*. La regeneración de NAD⁺ mediante NADH oxidasa causa el consumo concomitante de oxígeno. Por tanto, en otra realización más, el absorbente microbiano de oxígeno es una bacteria de ácido láctico que tiene fenotipo Ldh⁻ y sobreexpresa NADH oxidasa. En otra realización más, el absorbente microbiano de oxígeno es una bacteria de ácido láctico que tiene fenotipo Ldh⁻ y Pfl⁺, es decir, que es defectuosa en las actividades tanto de lactato deshidrogenasa como de piruvato formato liasa. Los métodos para producir dichas cepas Ldh⁻ se divulgan en los documentos WO 98/54337, EP 0937774 y EP 0928333. Estos documentos también divulgan ensayos adecuados para la cuantificación de la velocidad de consumo de oxígeno por estos microorganismos. Típicamente, se inocula un líquido como leche desnatada a 30 °C con una cantidad adecuada de microorganismos, por ejemplo 10⁷ UFC/ml, y se mide la concentración de oxígeno en el líquido a lo largo del tiempo.

En otra realización más, el absorbente microbiano de oxígeno es *Lactococcus lactis*. En otra realización más, el absorbente microbiano de oxígeno es un *Lactococcus lactis*, que consume oxígeno y no produce ácido láctico. En otra realización más, el absorbente microbiano de oxígeno es una cepa de *Lactococcus lactis* que es Ldh⁻, por ejemplo, DN-224 (DSM 11037). En otra realización más, el absorbente microbiano de oxígeno es una cepa de *Lactococcus lactis* que es Ldh⁻ y Pfl⁺, por ejemplo, DN-223 (DSM 11036). En otra realización más, el absorbente microbiano de oxígeno es una cepa de *Lactococcus lactis* que es Ldh⁻ y sobreexpresa NADH oxidasa.

En otras realizaciones, el absorbente microbiano de oxígeno no produce cantidades significativas de ácidos orgánicos y dióxido de carbono. En otra realización más, el absorbente microbiano de oxígeno es *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. En otra realización más, el absorbente microbiano de oxígeno es una cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* que es Ldh⁻. En otra realización más, el absorbente microbiano de oxígeno es un *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* que es Ldh⁻ y Pfl⁺. En otra realización más, el absorbente microbiano de oxígeno es una cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* que es Ldh⁻ y sobreexpresa NADH oxidasa.

En otra realización, el absorbente microbiano de oxígeno es capaz de disminuir la concentración de oxígeno en leche desnatada a 30 °C desde aproximadamente 8 mg/kg a menos de 1 mg/kg en menos de 3 después de inocular la leche desnatada con 10⁶ UFC/ml del absorbente microbiano de oxígeno.

En otra realización, el absorbente microbiano de oxígeno es capaz de disminuir la concentración de oxígeno en una solución de peptona al 0,1 %, NaCl al 0,85 % y lactosa al 3 % a 30 °C desde aproximadamente 8 mg/kg a menos de 1 mg/kg en menos de 3 después de inocular la leche desnatada con 10⁶ UFC/ml del absorbente microbiano de oxígeno.

Pueden conservarse una gran variedad de productos alimenticios de acuerdo con la presente invención. Los productos lácteos, como el queso, son particularmente preferidos. El producto alimenticio puede seleccionarse del grupo que consiste en un producto cárnico en lonchas, un alimento precocinado incluyendo un producto cocinado al vacío, o un producto de panadería.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los ejemplos siguientes.

Referencias

L. Vermeiren, F. Devlieghere, M. van Best, N de Kruijf, J. Debevere. 1999. Developments in the active packaging of foods. Trends in Food Science & Technology 10: 77-86.

L. Vermeiren, F. Heirlings, F. Devlieghere, J. Debevere. 2003. Oxygen, ethylene and other scavengers. En: R. Ahvenainen (Ed.) Novel Food Packaging Techniques. Woodhead Publishing, Cambridge, páginas 22-49.

Ejemplos

Ejemplo 1.

El objetivo es evaluar el efecto del absorbente microbiano de oxígeno en quesos bajos en grasa y altos en grasa.

El absorbente microbiano de oxígeno, *Lactococcus lactis*, se obtuvo de Chr. Hansen (F-DVS DN-224, depositado con el número de acceso DSM 11037). Se produjeron los siguientes medios de crecimiento que contienen lactosa y proteasa peptona:

Lactosa al 0,25 %:

1,0 g de peptona
8,5 g de NaCl
2,5 g de lactosa
1000 ml de agua desmineralizada

Lactosa al 0,50%:

1,0 g de peptona
8,5 g de NaCl
5,0 g de lactosa
1000 ml de agua desmineralizada

Lactosa al 0,75%:

1,0 g de peptona
8,5 g de NaCl
7,5 g de lactosa
1000 ml de agua desmineralizada

Se autoclavó el medio de crecimiento, se enfrió a 30 °C, y se añadieron 100 g de F-DVS DN-224. Esto proporcionó una concentración de bacterias de 10^8 UFC/ml.

Se evaluaron dos tipos de queso: Un queso semicurado bajo en grasa (5 % de grasa en materia seca) y un queso semicurado alto en grasas (60 % de grasa en materia seca). Estos productos se cortaron en lonchas, y se roció la superficie con la lechada de bacterias. Estos quesos se empaquetaron a continuación en un envase comercial hecho de APET/PE y con una tapa que consiste en OPA/PE. Se usó una atmósfera que contenía un 30-33 % de CO₂ y un máximo del 0,5 % de O₂, y con N₂ como gas de relleno. Los productos se almacenaron a 5 °C en la oscuridad hasta el momento de la toma de muestras.

Los productos se evaluaron después de 9, 11, 13 y 15 semanas para el queso bajo en grasa y después de 15, 17, 19, y 21 semanas respecto al queso alto en grasas. Se efectuaron las siguientes evaluaciones: Contenido de gas (O₂ y CO₂) y evaluaciones sensoriales. Además, se evaluaron el pH, mapeo de péptidos y compuestos aromáticos volátiles después de 13 y 15 semanas para el queso bajo en grasa y después de 19 y 21 semanas respecto del queso alto en grasas.

Los resultados se listan en la Tabla 1. Por claridad, solo se listan los resultados después de 13 y 15 semanas para los quesos bajos en grasa y los resultados después de 19 y 21 semanas respecto del queso alto en grasas. Se aplicó la batería completa de pruebas a esos tiempos de retirada.

Tabla 1. Efecto del uso de un absorbente microbiano de oxígeno sobre las propiedades físicas, químicas y sensoriales de quesos semicurados bajos en grasa y altos en grasa.

Producto	Absorbente microbiano de O ₂	Tiempo de almacenaje (semanas)	O ₂ (Nota 1)	CO ₂ (Nota 1)	pH	Diacetil "ppm"	Mapeo de péptidos	Evaluaciones sensoriales
Queso bajo en grasas	-	13	0,021	20,2	5,60	0,457	Se aprecian diferencias en los perfiles peptídicos de quesos de 13 y 15 semanas	Se mejoraron el sabor y olor cuando se usó el absorbente microbiano de O ₂
	+	13	0,013	20,3	5,53	0,625		
	-	15	0,019	20,2	5,53	0,556	No se encontraron diferencias en los perfiles peptídicos de productos con o sin absorbente microbiano	Se mejoraron el sabor y olor cuando se usó el absorbente microbiano de O ₂
	+	15	0,005	21,4	5,53	0,727		
Queso alto en grasas	-	19	0,050	17,2	5,13	1,039	Se aprecian diferencias en los perfiles peptídicos de quesos de 19 y 21 semanas	Se mejoró el sabor cuando se usó el absorbente microbiano de O ₂ en combinación con altas concentraciones de lactosa. No se apreciaron diferencias explícitas en el olor
	+	19	0,020	20,7	5,19	0,945		
	-	21	0,040	19,1	5,10	0,674	Se apreciaron ligeras diferencias en perfiles de productos con y sin absorbente microbiano	Se mejoró el olor cuando se usó el absorbente microbiano de O ₂ . No se apreciaron diferencias pronunciadas en el sabor
	+	21	0,029	19,0	5,11	0,952		

Nota 1: Solo resultados de lactosa al 0,75 %. Se apreció la misma tendencia para las otras dos concentraciones de lactosa.

- 5 No se apreció efecto del absorbente microbiano de oxígeno sobre el pH ni en queso bajo en grasas o quesos altos en grasas. El absorbente puede tener un leve efecto en la maduración de quesos altos en grasas. Se apreciaron niveles aumentados de diacetil y acetoina (ejemplificado por diacetil en la Tabla 1) en los quesos. Estos compuestos tienen un efecto positivo sobre el sabor de los productos lácteos. Evaluaciones sensoriales simples revelaron un efecto positivo del absorbente microbiano de oxígeno.

Ejemplo 2.

El objetivo fue evaluar el efecto del absorbente microbiano de oxígeno a diferentes niveles de oxígeno residual.

- 5 El absorbente microbiano de oxígeno, *Lactococcus lactis*, se obtuvo a través de Chr. Hansen (F-DVS DN-224). Se produjo el siguiente medio de crecimiento que contiene lactosa y proteasa peptona:

Lactosa al 3%:

- 10 1,0 g de peptona
8,5 g de NaCl
30 g de lactosa
1000 ml de agua desmineralizada

- 15 Se autoclavó el medio de crecimiento, se enfrió a 20 °C, y se añadieron 10 g de F-DVS DN-224. Esto proporcionó una concentración de bacterias de 47×10^7 UFC/ml. Se usó una referencia que contenía solo la solución de peptona para la comparación.

- 20 Se pusieron 40 ml de lactosa al 3 %/agua de peptona o agua de peptona con/sin el absorbente microbiano de oxígeno en una bandeja que consiste en APET/PE y una tapa que consiste en OPA/PE. Se aplicaron tres combinaciones de gas de envasado orientadas a las siguientes concentraciones de oxígeno residual: 0,3 %, 1 %, y 21 % (aire atmosférico). El CO₂ fue constante a aproximadamente el 25 % para los gases reducidos en oxígeno y de aproximadamente el 0 % para el aire atmosférico. N₂ se usó como gas de relleno.

- 25 Los paquetes se almacenaron a 9 °C y 20 °C durante 0, 7, 12, y 20 días.

- En el momento de la toma de muestras, se midieron el contenido de gas (O₂ y CO₂) y el crecimiento de *Lactococcus lactis* (agar M17). El contenido en lactosa y pH se midieron al comienzo y al final del experimento. Se efectuaron medidas consecutivas en el mismo paquete durante el experimento. Se promediaron y basaron los resultados en determinaciones por triplicado. Los resultados de las medidas de oxígeno se listan en las Figuras 2 y 3.

- 30 El absorbente microbiano de oxígeno redujo el nivel de oxígeno en comparación con un control sin el absorbente microbiano de oxígeno.

35 Ejemplo 3.

Se han efectuado ensayos de producto con el absorbente microbiano de oxígeno y queso Cheddar.

- 40 El objetivo fue evaluar el efecto del absorbente microbiano de oxígeno a diferentes niveles de oxígeno residual, y con y sin inoculación de *Penicillium camemberti*.

El absorbente microbiano de oxígeno, *Lactococcus lactis*, se obtuvo a través de Chr. Hansen (F-DVS DN-224). Se produjo el siguiente medio de crecimiento que contiene lactosa y proteasa peptona:

45 Lactosa al 3%:

- 50 1,0 g de peptona
8,5 g de NaCl
30 g de lactosa
1000 ml de agua desmineralizada

- Se autoclavó el medio de crecimiento, se enfrió a 20 °C, y se añadieron 0,5 g de F-DVS DN-224. Esto proporcionó una concentración de bacterias de 27×10^6 UFC/ml. Se usó una referencia que contenía únicamente la solución de lactosa/peptona para comparación.

- 55 La cepa de *Penicillium camemberti* se localizó en Kvibille Dairy y se creció en agar DYES (diclorán extracto de levadura sacarosa). Se resuspendieron las esporas en agua esterilizada para obtener una solución de 10⁶ esporas/ml. La solución de *Penicillium camemberti* tenía una concentración de 12x10⁵ esporas/ml.

- 60 Se pusieron 40 ml de lactosa al 3 %/agua de peptona con/sin el absorbente microbiano de oxígeno en una bandeja que consiste en APET/PE y una tapa que consiste en OPA/PE. Se empaparon en parafina tacos de Cheddar que pesaban aproximadamente 100 g y se secaron. El Cheddar se colocó en la bandeja, y se inocularon la mitad de las muestras con 10 ml de la suspensión de *Penicillium camemberti*:

- 65 Se aplicaron tres combinaciones de gas de envasado orientadas a las siguientes concentraciones de oxígeno residual: 0,3 %, 1%, y 21 % (aire atmosférico). El CO₂ fue constante a aproximadamente el 25 % para los gases reducidos en

oxígeno y de aproximadamente el 0 % para el aire atmosférico. N₂ se usó como gas de relleno.

Los paquetes se almacenaron a 9 °C y 20 °C durante 0, 5, 10, y 20 días.

- 5 En el momento de la toma de muestras, se midieron el contenido de gas (O₂ y CO₂) y el crecimiento de *Lactococcus lactis* (M17 agar). El contenido en lactosa y pH se midieron al comienzo y al final del experimento. Se efectuaron medidas consecutivas en el mismo paquete durante el experimento. Se promediaron y basaron los resultados en determinaciones por duplicado.
- 10 En las muestras que contenían únicamente el absorbente microbiano de oxígeno, es decir, sin inoculación de *Penicillium camemberti*, se apreció un claro efecto de la presencia del absorbente en el contenido de oxígeno residual. Cuando se compararon las muestras con tanto el absorbente microbiano como *Penicillium camemberti*, pareció que el moho aparentemente usó el oxígeno presente y que los niveles de oxígeno se redujeron significativamente en los productos que contenían tanto el absorbente microbiano de oxígeno como el *Penicillium camemberti* en comparación
- 15 con las muestras que contenían únicamente el absorbente microbiano de oxígeno.

Ejemplo 4.

20 El objetivo del experimento es evaluar el efecto del absorbente microbiano sobre los cambios de calidad causados por exposición a la luz.

Se ensayan diferentes niveles de oxígeno residual (entre el 0-5 %). Los quesos se empaquetan en materiales de envasado comerciales, el absorbente microbiano de oxígeno se rocía sobre las superficies del queso, y a continuación, los quesos se empaquetan en atmósferas modificadas y almacenan a temperaturas enfriadas en la oscuridad o se

25 exponen a luz (asemejándose a las condiciones de expositores de venta). En el momento de la retirada, se evaluó el contenido de gases (O₂ y CO₂), y se efectúan evaluaciones físico-químicas, microbianas y sensoriales relevantes.

Ejemplo 5.

30 El objetivo del experimento es optimizar el sistema de absorbente microbiano de oxígeno.

Se evalúan los siguientes parámetros:

- Diferentes sustratos de crecimiento (leche, agua de peptona, hidrolizados de la leche y agua)
- 35 • diferentes temperaturas de crecimiento (5 °C, 9 °C, y 20 °C)
- Concentración óptima de material absorbente microbiano (porcentaje de inoculación)
- Método de aplicación.

Ejemplo 6.

40 El objetivo del experimento es evaluar la combinación óptima de absorbente microbiano de oxígeno y contenido residual de oxígeno, que puede seguidamente dar como resultado velocidades mayores de máquinas de envasado. El experimento incluye técnicas de rociado y evaluaciones de diferentes concentraciones de oxígeno (por ejemplo, 0,1, 0,3, 1, y 5 % de O₂). Finalmente, tiene lugar el aumento de escala de los experimentos en distintos productos lácteos.

45 Otros productos alimenticios también se incluyen en las evaluaciones.

Ejemplo 7.

50 Se coloca queso en lonchas Delite 5 % en bandejas de plástico y se rocía sobre el queso *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DN224 en una solución de lactosa/peptona.

Se empaquetan las bandejas de plástico con un gas que tiene la siguiente composición: 0,4 % de O₂ y 43,5 % de CO₂.

55 Las concentraciones de O₂ y CO₂ en el espacio superior del queso envasado se miden después del envasado así como después del experimento.

Se usan los siguientes materiales:

60 Bandejas Nr. Vium (GL440, 400 mu APET/40 mu PE) y tapas (15 mu OPA/40 mu PE) queso en lonchas Delite 5% de Nr. Vium dairy.

Composición de gas usada para el envasado: 43,5 % de dióxido de carbono y 0,4 % de oxígeno.

La solución de lactosa/peptona contiene:

NaCl	8,5 g
Peptona	1,0 g
lactosa	30,0 g
Agua	1 litro
Autoclavada a 121 °C durante 45 minutos	

El queso se inocula con la siguiente cantidad de *Lactococcus lactis* DN-224:

- 5 se añaden 10 g de cultivo de *Lc. lactis* congelado por litro de solución lactosa/peptona. Se añade a cada queso para envasado en una bandeja de plástico 1 ml de la lactosa/peptona mediante rociado.

- 10 Las bandejas de plástico se empaquetan (sellan) usando un Multivac T200 de Multivac.

Los quesos envasados se incuban a 20 °C y a 9 °C.

Se preparan los siguientes productos de queso envasados:

- 15 1. 9 bandejas con queso, *Lc. lactis* y solución de lactosa/peptona.
2. 9 bandejas con queso y solución de lactosa/peptona.
3. 9 bandejas con queso y agua estéril.
4. 9 bandejas con *Lc. Lactis* y solución de lactosa/peptona.
20 5. 9 bandejas con solución de lactosa/peptona.

REIVINDICACIONES

1. Un envase para alimentos, que comprende un material de envasado y un absorbente microbiano de oxígeno seleccionado de las cepas absorbentes de oxígeno de *Lactococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Brevibacterium spp.*, *Propionibacterium spp.* y *Bifidobacterium spp.*.
2. El envase de acuerdo con la reivindicación 1, aplicándose dicho absorbente microbiano de oxígeno, como por ejemplo mediante una operación de rociado, sobre la superficie de dicho material de envasado adaptado para estar dirigido hacia un compartimento de almacenamiento de alimentos de dicho envase.
3. El envase de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde dicho material de envasado comprende al menos dos capas, una capa definiendo una barrera y otra capa comprendiendo dicho absorbente microbiano de oxígeno.
4. El envase de acuerdo con la reivindicación 3, comprendiendo además dicho material de envasado una capa permeable a gas, comprendiendo dicha capa dicho absorbente microbiano de oxígeno dispuesto entre dicha barrera y dicha capa permeable a gas.
5. El envase de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, conformándose dicho material de envasado, de forma tal como moldeado por inyección o embutición profunda.
6. El envase de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, siendo dicho material de envasado flexible.
7. El material de envasado de acuerdo con la reivindicación 4, siendo dicha capa no permeable a gas de vidrio o metal.
8. El envase de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde dicho absorbente microbiano de oxígeno es un *Lactococcus lactis* que consume oxígeno y no produce ácido láctico.
9. El envase de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que dicho absorbente microbiano de oxígeno no produce cantidades significativas de ácidos orgánicos y dióxido de carbono.
10. El envase de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde dicho absorbente microbiano de oxígeno es
 - una cepa que tiene el fenotipo Ldh⁻, por ejemplo, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DN-224 depositada como DSM 11037,
 - una cepa que tiene el fenotipo Ldh⁻ y el fenotipo Pfl⁻, por ejemplo, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DN-223 depositada como DSM 11036,
 - una cepa que sobreexpresa NADH oxidasa, por ejemplo, una cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, o
 - *Lactococcus lactis*, por ejemplo, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*.
11. El envase de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde dicho absorbente microbiano de oxígeno es una bacteria de ácido láctico que ha sido cultivada en presencia de al menos un compuesto de porfirina.
12. Bolsita, etiqueta, cápsula o gránulos de polvo liofilizado que comprenden un absorbente microbiano de oxígeno seleccionado de cepas absorbentes de oxígeno de *Lactococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Brevibacterium spp.*, *Propionibacterium spp.* y *Bifidobacterium spp.* y los sustratos necesarios para que el absorbente microbiano de oxígeno asimile el oxígeno tras exposición a vapor de agua.
13. Producto alimenticio envasado en un envase para alimentos, que comprende un material de envasado y un absorbente microbiano de oxígeno seleccionado de las cepas absorbentes de oxígeno de *Lactococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Brevibacterium spp.*, *Propionibacterium spp.* y *Bifidobacterium spp.*, en donde dicho absorbente microbiano de oxígeno se ha aplicado a la superficie del producto alimenticio.
14. El producto alimenticio de acuerdo con la reivindicación 13, en donde dicho absorbente microbiano de oxígeno se ha aplicado a la superficie del producto alimenticio rociando una lechada del mismo.
15. El producto alimenticio de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-14, en donde cualquier gas dentro del envase tiene un contenido de oxígeno reducido o igual comparado con el aire atmosférico, tal como menos de un 1 % de oxígeno, menos del 0,05 % de oxígeno o menos del 0,01 % de oxígeno.

16. El producto alimenticio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13-15, en donde el absorbente microbiano de oxígeno es *Lactococcus lactis*.
- 5 17. El producto alimenticio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13-16, en donde dicho absorbente microbiano de oxígeno es
- una cepa que tiene el fenotipo Ldh^- , por ejemplo, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DN-224 depositado como DSM 11037,
 - una cepa que tiene el fenotipo Ldh^- y el fenotipo Pfl^- , por ejemplo, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DN-223 depositada como DSM 11036,
 - una cepa que sobreexpresa NADH oxidasa, por ejemplo, una cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, o
 - *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*.
- 10 18. El producto alimenticio de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-17, estando dicho material de envasado envuelto alrededor de dicho producto alimenticio.
- 15 19. El producto alimenticio de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-18, incluyendo el envase un espacio entre dicho material de envasado y el producto alimenticio.
- 20 20. El producto alimenticio de acuerdo con la reivindicación 19, en donde el volumen de dicho espacio superior es de 10 ml a 200 ml, y el peso de dicho producto alimenticio es de 100 gramos a 1000 gramos, y la cantidad de absorbente microbiano de oxígeno aplicado a dicho producto alimenticio es de 10^3 a 10^9 UFC.
- 25 21. El producto alimenticio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13-20, en donde dicho material de envasado es un recubrimiento, por ejemplo, recubrimiento de plástico Dutch, cera de parafina u otros recubrimientos basados en lípidos, aplicado directamente sobre la superficie del producto alimenticio con dicho absorbente microbiano de oxígeno entre dicho producto alimenticio y dicho recubrimiento.
- 30 22. El producto alimenticio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13-21, envasado en una atmósfera modificada.
- 35 23. Un método para la conservación de un producto alimenticio envasando dicho producto alimenticio en un envase para alimentos, que comprende un material de envasado, preferentemente un material que defina una barrera adaptada para evitar o minimizar de modo convencional la entrada de aire en el envase, y un absorbente microbiano de oxígeno seleccionado de las cepas absorbentes de oxígeno de *Lactococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Brevibacterium spp.*, *Propionibacterium spp.* y *Bifidobacterium spp.*, en donde dicho absorbente microbiano de oxígeno se aplica a la superficie del producto alimenticio.
- 40 24. El método de acuerdo con la reivindicación 23, en donde dicho absorbente microbiano de oxígeno se aplica mediante rociado de una lechada que contiene dicho absorbente microbiano de oxígeno sobre el producto alimenticio, comprendiendo opcionalmente dicha lechada uno o más nutrientes para el absorbente microbiano de oxígeno, por ejemplo, una fuente de carbono y/o nitrógeno.

Figura 1a

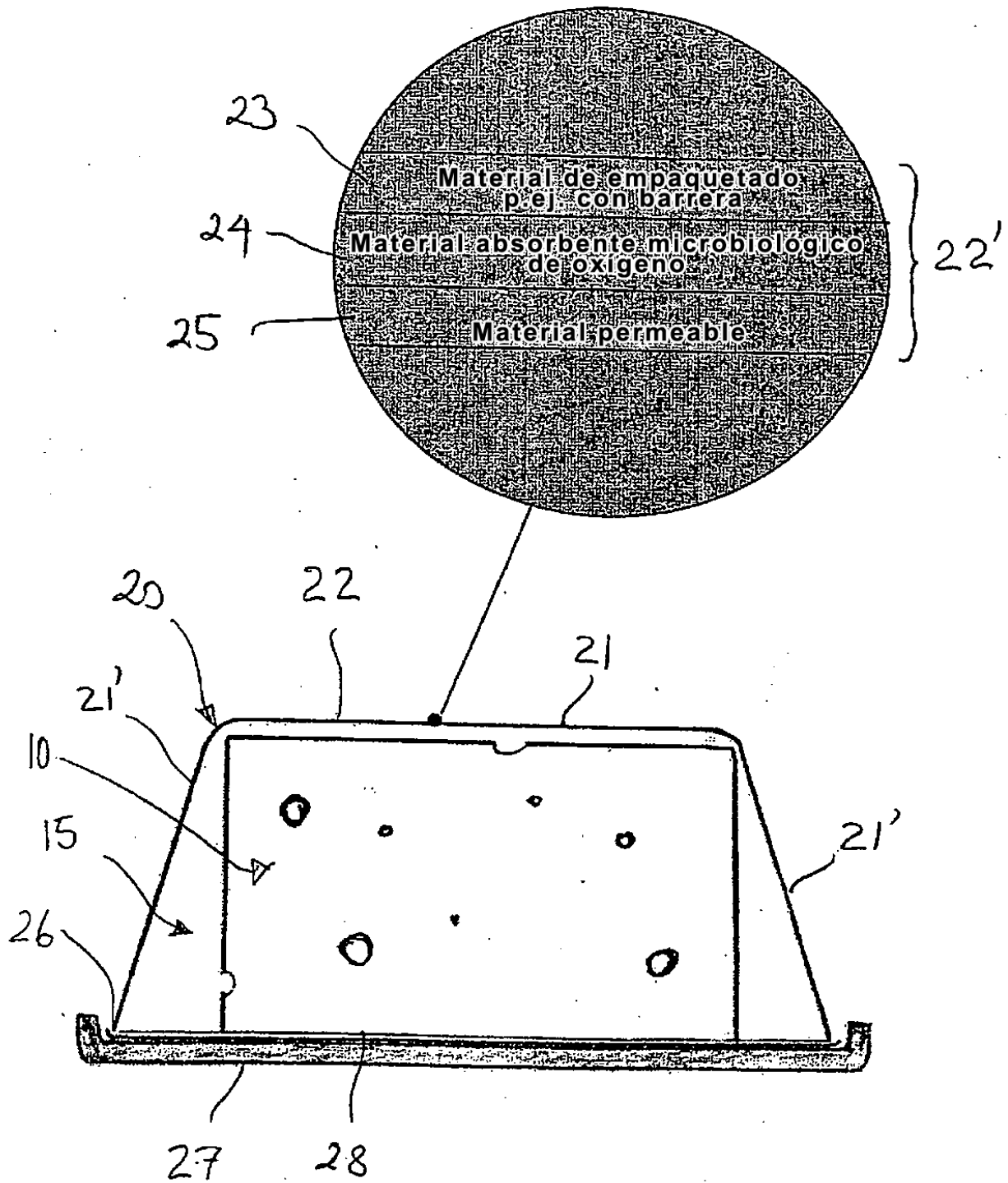


Fig. 1b

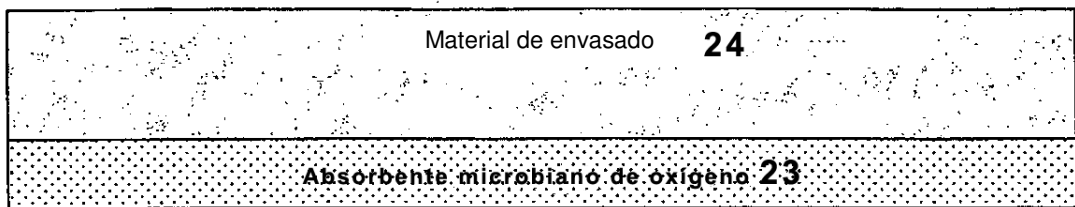


Fig. 1c

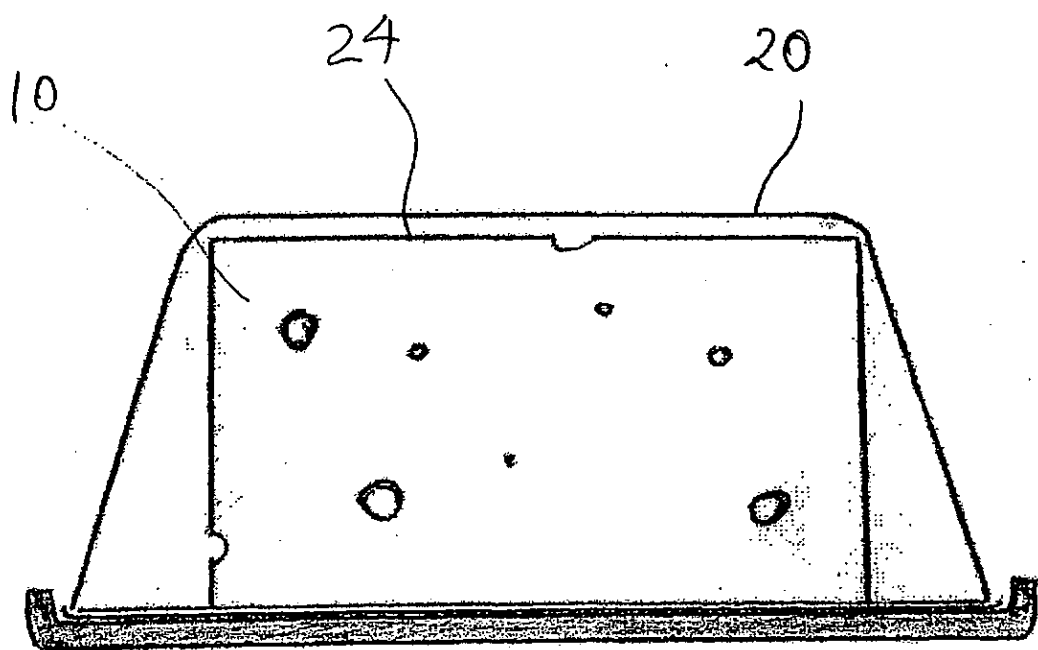


Fig. 2

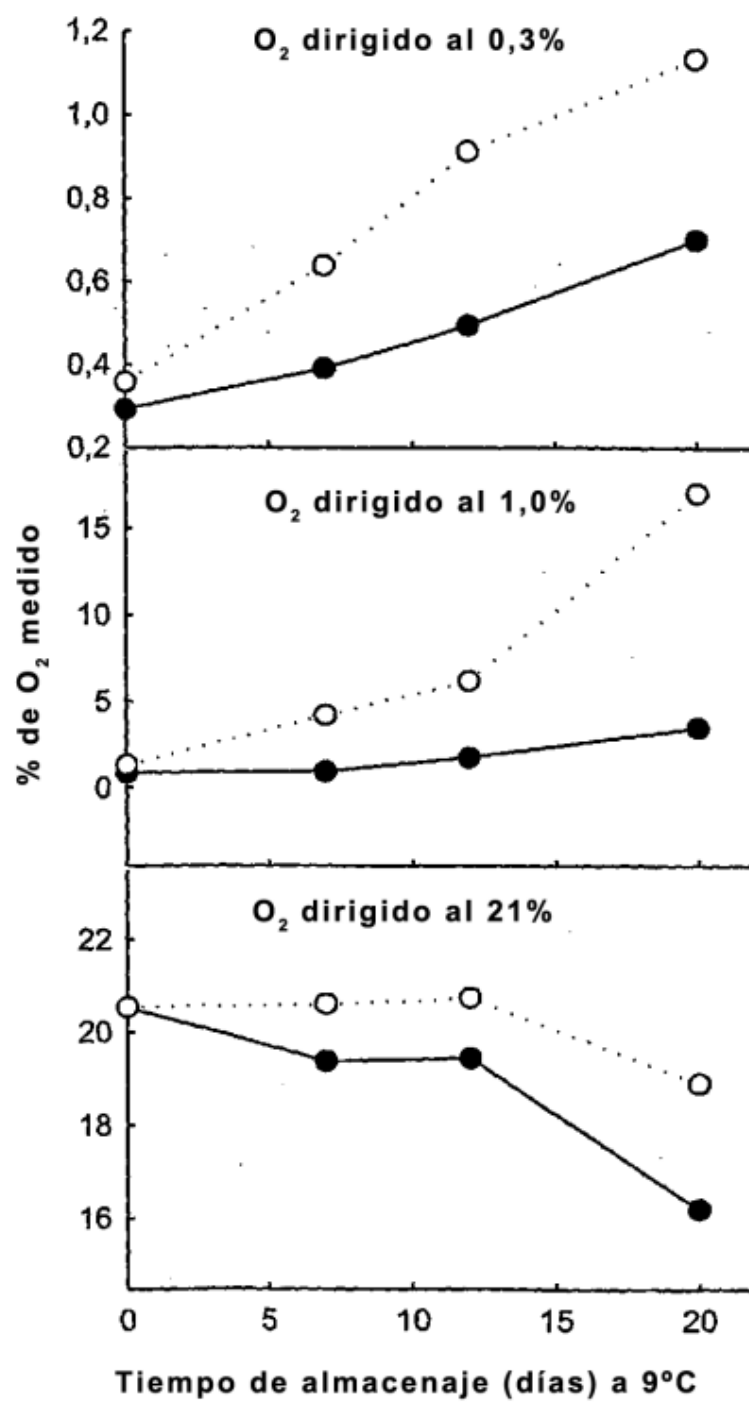


Fig. 3

